

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN KACANG  
GUDE (*Cajanus cajan*) TERHADAP SEL KANKER  
MCF-7 DAN T47D**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Jurusan Farmasi  
Fakultas Farmasi**

**Oleh:**

**RISKA SANTRI UTAMI**

**K 100 150 157**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
2019**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN KACANG GUDE  
(*Cajanus cajan*) TERHADAP SEL KANKER MCF-7 DAN T47D**

**PUBLIKASI ILMIAH**

oleh:

**RISKA SANTRI UTAMI**

**K 100 150 157**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



**Ratna Yuliani, S.Si., M.Biotech.St.**  
**NIK.957**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN KACANG  
GUDE (*Cajanus cajan*) TERHADAP SEL KANKER  
MCF-7 DAN T47D**

**OLEH**

**RISKA SANTRI UTAMI**

**K 100 150 157**

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji  
Fakultas Farmasi  
Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Pada hari Senin, 28 Januari 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

**Dewan Penguji:**

- 1. Ika Trisharyanti DK., M.Farm., Apt.  
(Ketua Dewan Penguji)**
- 2. Ambar Yunita Nugraheni, M.Sc., Apt.  
(Anggota I Dewan Penguji)**
- 3. Ratna Yuliani, S.Si, M.Biotech.St.  
(Anggota II Dewan Penguji)**

(.....)  
(.....)  
(.....)

**Dekan,**  
  
**Aziz Sufudin, Ph.D., Apt.  
NIK. 956**

## **PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

**Surakarta, 31 Desember 2018**

Penulis



**RISKA SANTRI UTAMI**

**K 100 150 157**

# AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK METANOL DAUN KACANG GUDE (*Cajanus cajan*) TERHADAP SEL KANKER MCF-7 DAN T47D

## Abstrak

Wanita memiliki resiko lebih tinggi terkena kanker dibandingkan dengan pria, terutama kejadian kanker payudara. Salah satu pengobatan kanker yang paling umum adalah dengan kemoterapi. Kemoterapi memiliki banyak efek samping, sehingga diperlukan alternatif obat lain. Kacang gude (*Cajanus cajan*) adalah salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak metanol daun kacang gude terhadap sel MCF-7 dan T47D. Penyarian dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Uji kualitatif senyawa menggunakan metode tabung untuk mengidentifikasi golongan senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan kumarin. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT dengan seri konsentrasi yaitu 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL. Daun kacang gude positif mengandung senyawa steroid, triterpenoid, flavonoid, dan tanin. Hasil uji sitotoksik menunjukkan ekstrak metanol daun kacang gude memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 93,353 µg/mL terhadap sel T47D dan 566,454 µg/mL terhadap sel MCF-7. Ekstrak metanol daun kacang gude tidak memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker terhadap sel MCF-7 dan T47D.

**Kata Kunci:** *Cajanus cajan*, T47D, MCF-7, MTT-assay

## Abstract

Women have higher risk to get cancer than men, especially breast cancer. One of the most common cancer treatments is chemotherapy. Chemotherapy has many side effects, therefore another alternative drug is needed. Pigeon pea (*Cajanus cajan*) is one of plants that has anticancer activity. This study aims to test cytotoxic activity of methanolic extract of pigeon pea leaves against MCF-7 and T47D cells. The extraction was carried out using the maceration method with methanol as solvent. Qualitative tests of compounds used the phytochemical screening method to identify groups of alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, tannins, quinones, and coumarin. The concentration series of pigeon pea leaves used for the cytotoxic test using the MTT method were 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL. The results showed that pigeon pea extract contains steroids, triterpenoids, flavonoids, and tannins. Cytotoxic test results showed that methanolic extract of pigeon pea leaves had an  $IC_{50}$  value of 93,353 µg/mL against T47D cells and had an  $IC_{50}$  value of 566,454 µg/mL against MCF-7 cells. The methanolic extract of pigeon pea leaves did not have the potential to be developed as an anticancer agent for MCF-7 and T47D cells.

**Keywords:** *Cajanus cajan*, T47D, MCF-7, MTT-assay

## 1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2015). Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (2013) prevalensi kanker pada wanita lebih tinggi dibandingkan pada pria. Menurut GLOBOCAN (2012) kanker payudara merupakan penyakit kanker dengan persentase kasus baru tertinggi sebesar 43,3% dan kematian sebesar 12,9%. Adapun pengobatan pada kanker payudara salah satunya ialah kemoterapi. Kemoterapi adalah penggunaan obat-obatan khusus untuk mematikan sel-sel kanker (Yudissanta and Madu, 2012). Menurut Rasjidi (2007) kemoterapi memiliki efek samping diantaranya anemia, trombositopenia, leukopenia, mual, dan muntah, maka diperlukan alternatif obat lain.

Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan sebagai obat antikanker adalah kacang gude (*Cajanus cajan*). Kacang gude adalah jenis tanaman kacang yang kaya akan flavonoid antara lain kajanol, kuersetin, dan luteolin (Rahayu and Roosmarinto, 2017). Maukar *et al.* (2013) mengatakan bahwa tumbuh-tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional banyak digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit termasuk kanker. Kacang gude banyak digunakan sebagai obat tradisional pada berbagai negara (Maintang, 2014).

Uji sitotoksisitas digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa dan merupakan uji toksisitas secara *in vitro* yang menggunakan kultur sel (Hetu, 2008). Uji sitotoksik menghasilkan data absorbansi yang selanjutnya dikonversi menjadi % sel hidup. Pada uji sitotoksik parameter yang digunakan adalah nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  pada uji sitotoksik ekstrak etanol daun kacang gude terhadap sel kanker payudara MCF-7 sebesar 52  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan pada sel HeLa dan CaCo-2 sebesar >80  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak tersebut dikatakan poten sebagai antikanker (Schuster *et al.*, 2016). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol daun kacang gude pada sel kanker kolon sebesar 307  $\mu\text{g/mL}$  (Rahayu and Roosmarinto, 2017). Selain itu, ekstrak metanol terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel adenokarsinoma payudara manusia (MCF-7), sel karsinoma paru-paru manusia (COR-L23), dan melanoma amelanotik manusia (C32) (Ashidi *et al.*, 2010). Pada penelitian ini dilakukan identifikasi senyawa dan uji sitotoksik ekstrak metanol daun kacang gude terhadap sel MCF-7 dan T47D.

## 2. METODE

### 2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian, diantaranya inkubator  $\text{CO}_2$  (Binder), *rotary evaporator* (Heidolph), mikropipet (Socorex), *waterbath* (Memmert), sonikator (Branson) vorteks (Maxi mix II), neraca analitik (Ohaus), mikroskop (Olympus), sentrifus (Hettich EBA 200), almari pengering, blender, corong buchner (Halden Wangger), *Beaker glass*, pipet Pasteur steril, tabung reaksi kecil

(Pyrex), *micro tube* (Onemed), *coulter counter*, *magnetic stirrer*, botol Schott Duran (Duran), *Laminar Air Flow/LAF* (ESCO), dan *ELISA reader* (Bio-tek).

## 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian, diantaranya daun kacang gude yang berasal dari daerah Nogosari Boyolali, Dimetil Sulfoksida (DMSO), Buffer Fosfat Salin (PBS), Fetal Bovin Serum (FBS), Sodium Dodesil Sulfat (SDS), *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *96-well plate* (Iwaki), *conical tube*, filter, larutan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), media kultur *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), media kultur *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI), alumunium foil, akuabides,  $\text{NaHCO}_3$ , HCl, NaOH, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer,  $\text{FeCl}_3$ , kloroform, doksorubisin, metotreksat, sel MCF-7, dan T47D.

## 2.3 Ekstraksi Daun Kacang Gude

Daun kacang gude sebanyak 300 gram dicuci lalu dikeringkan di almari pengering. Daun kering diserbuk kemudian ditimbang sebanyak 150 gram, dimaserasi dengan metanol teknis sebanyak 1,8 L sampai terendam, didiamkan selama 72 jam pada suhu ruang, dan sesekali diaduk. Filtrat dan ampasnya dipisahkan kemudian filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak yang diperoleh kemudian diletakkan di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

## 2.4 Uji Kualitatif Senyawa Menggunakan Skrining Fitokimia

Uji kualitatif untuk mengidentifikasi golongan senyawa dalam ekstrak metanol daun kacang gude dilakukan berdasarkan Djamil and Anelia (2009) yang telah dimodifikasi:

### 2.4.1 Uji alkaloid

Ekstrak sebanyak  $\pm 40$  mg dilembabkan dengan 5 ml ammonia 25% digerus dalam mortir dan ditambahkan 20 ml kloroform kemudian digerus dengan kuat. Campuran tersebut disaring dengan kertas saring. Larutan A terbentuk sebagai filtrat berupa larutan organik, sebagian larutan A diambil sebanyak 10 mL diekstraksi dengan 10 mL larutan HCl 1:10 dengan pengocokan tabung reaksi, kemudian diteteskan beberapa tetes pada kertas saring dan disemprot dengan pereaksi Dragendorff akan terbentuk warna merah atau jingga pada kertas saring. Larutan bagian atas hasil pengocokan larutan A diambil sebagai larutan B. Pada larutan B dibagi dalam dua tabung reaksi kemudian masing-masing ditambahkan pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan merah bata dan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih.

### 2.4.2 Uji steroid dan terpenoid

Ekstrak sebanyak  $\pm 8$  mg dimaserasi dengan 5 mL eter di dalam wadah dengan penutup rapat selama 2 jam, kemudian disaring hingga diperoleh filtrat. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan penguap sampai diperoleh residu. Pada residu ditambahkan pereaksi Liebermann-Buchard

yaitu 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat akan terbentuk warna hijau atau merah.

#### 2.4.3 Uji flavonoid

Ekstrak sebanyak  $\pm 8$  mg, ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring hingga didapatkan filtrat sebagai larutan percobaan. Selanjutnya ditambahkan lempeng Mg secukupnya, 1 mL HCl pekat, dan 5 mL amil alkohol pada 5 mL larutan percobaan didalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

#### 2.4.4 Uji saponin

Sebanyak 10 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi golongan flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok selama 10 menit secara vertikal dan didiamkan selama 10 menit. Penambahan 1 tetes HCl 1% akan terbentuk busa yang stabil.

#### 2.4.5 Uji tanin

Ekstrak sebanyak  $\pm 8$  mg dididihkan dengan 100 mL air selama 15 menit, kemudian disaring saat dingin menggunakan kertas saring. Penambahan  $\text{FeCl}_3$  1 % akan terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman.

#### 2.4.6 Uji kuinon

Sebanyak 5 mL larutan percobaan yang diperoleh dari identifikasi flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Penambahan larutan NaOH 1 N akan terbentuk warna merah.

#### 2.4.7 Uji kumarin

Ekstrak sebanyak  $\pm 8$  mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan volume 10 mL kemudian ditambahkan 2 mL kloroform. Selanjutnya dipasang corong yang telah diberi lapisan kapas basah pada mulut tabung, kemudian tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air selama 20 menit dan didinginkan. Penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat kemudian diuapkan dengan cawan penguap hingga kering sedangkan ke dalam residu ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan, dan dimasukkan pada tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan ammonia 10% akan terbentuk fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm.

### 2.5 Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak daun kacang gude ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 100  $\mu\text{L}$  DMSO. Larutan divorteks selama 5 menit, kemudian disonifikasi selama 30 menit lalu divorteks kembali selama 5 menit. Selanjutnya media DMEM ditambahkan untuk sel MCF-7 dan media RPMI untuk sel T47D hingga 1000  $\mu\text{L}$ . Seri konsentrasi larutan uji dibuat dari larutan stok yaitu 800, 400, 200, 100, 50  $\mu\text{g/mL}$ .



## 2.6 MTT-assay

Uji sitotoksik diawali dengan kultur dan panen sel. Sel dilihat dibawah mikroskop dan dihitung dengan *coulter counter*. Sel dikultur pada 96-well plate dengan kepadatan sel MCF-7 dan T47D masing-masing  $10^4$  sel/mL. Masing-masing sel ditransfer ke dalam sumuran sebesar 100  $\mu$ L dan disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media. Sel diamati menggunakan *inverted microscope* kemudian diinkubasi dengan waktu inkubasi untuk sel MCF-7 selama 48 jam dan T47D selama 24 jam. Seri konsentrasi ekstrak metanol daun kacang gude dan kontrol positif (metotreksat dan doksorubisin) masing-masing dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak tiga kali replikasi, kemudian dimasukkan kontrol pelarut (DMSO). Selanjutnya reagen MTT disiapkan untuk perlakuan sebesar 0,5 mg/mL dengan cara mengambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL) kemudian diencerkan dengan media kultur sampai 10 mL. Media sel dibuang dengan cara membalikkan plate kemudian dicuci dengan menggunakan larutan PBS. Sebanyak 100  $\mu$ l reagen MTT dimasukkan pada setiap sumuran (termasuk kontrol media), kemudian diinkubasi selama 4 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan suhu 37 °C. Kondisi sel diperiksa dengan *inverted microscope*. Apabila kristal formazan sudah terbentuk dengan jelas, ditambahkan 100  $\mu$ l SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Plate dibungkus dengan kertas aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Absorbansi dibaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dan analisis nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan menggunakan *microsoft excel* (Cancer Chemoprevention Research Center, 2014).

## 2.7 Teknik Analisis Data

### 2.7.1 Uji Skrining Fitokimia

Teknik analisis hasil dilakukan dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Tabel 1).

Tabel 1. Analisis hasil skrining fitokimia

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	Dragendorff	Warna merah atau jingga pada kertas saring
	Mayer	Endapan putih
Steroid dan triterpenoid	Liebermann-Burchard	Warna hijau atau merah
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Warna kuning pada lapisan amil alkohol
Saponin	Air + HCl 1%	Busa stabil
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Warna hijau kehitaman atau biru tua
Kuinon	NaOH	Warna merah
Kumarin	Kloroform + ammonia 10%	Fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV

### 2.7.2 Uji Sitotoksik

Teknik analisis hasil dilakukan dengan menghitung persentase sel hidup. Persentase sel hidup dapat dihitung dengan rumus tertentu dari absorbansi yang diperoleh kemudian dicari hubungan regresi linier antara log konsentrasi dengan % sel hidup menghasilkan persamaan  $y = bx + a$ . Rumus perhitungan % sel hidup sebagai berikut:

Nilai absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel, sehingga dihitung persentase sel hidup dengan rumus:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Ekstraksi

Daun kacang gude diekstraksi menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dingin dengan prinsip pencapaian konsentrasi pada keseimbangan dan tujuannya untuk menarik zat-zat berkhasiat yang terdapat pada ekstrak baik yang bersifat tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000). Maserasi dipilih karena merupakan cara ekstraksi paling sederhana dengan hasil rendemen ekstraksi tinggi, menurut Koirewoa *et al.* (2012) akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel pada proses perendaman simplisia sehingga metabolit sekunder yang terdapat didalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Metanol dipilih sebagai pelarut karena merupakan pelarut pilihan utama untuk mengekstraksi metabolit sekunder serta memiliki daya ekstraksi yang luas. Bagian dari kacang gude yang dipilih untuk diuji adalah daunnya. Daun memiliki kandungan metabolit sekunder yang bermacam-macam, baik non polar yaitu steroid dan triterpenoid maupun semi polar yaitu flavonoid, dan senyawa polar yaitu polifenol, glikosida atau terpenoid terhidroksilasi (Saifudin, 2014). Senyawa yang dapat tersari pada pelarut metanol adalah senyawa yang bersifat polar, semi dan non polar (Astria, 2013).

Hasil yang didapat dari ekstraksi yaitu rendemen sebesar 11,36% dengan warna ekstrak hijau pekat. Warna hijau pekat yang dihasilkan diduga karena pelarut juga mengekstraksi klorofil yang ada dalam daun kacang gude. Pada penelitian Ashidi *et al.* (2010) hasil rendemen ekstrak metanol daun kacang gude sebesar 12,92%. Besar kecilnya nilai rendemen menunjukkan efektivitas proses ekstraksi yang dipengaruhi oleh jenis pelarut, ukuran partikel, metode, dan lama ekstraksi (Permawati, 2008). Semakin banyak rendemen yang dihasilkan, maka semakin banyak zat aktif dari ekstrak yang tersari. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan diluar sel, maka akan mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel (Shaleh, 2016). Penyebab perbedaan hasil rendemen tersebut diduga

karena perbedaan metode ekstraksi yang digunakan. Ashidi *et al.* (2010) menggunakan metode perkolasi, sedangkan metode ekstraksi pada penelitian ini adalah metode maserasi. Metode perkolasi merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, prosesnya dilakukan dengan cara meneteskan cairan penyari dalam wadah berbentuk silinder (perkolator) (Pratiwi, 2010) sehingga zat aktif yang tersari lebih banyak. Pada penelitian Koirewoa *et al.* (2012) proses pengadukan pada proses maserasi dapat membantu proses ekstraksi lebih sempurna karena terjadi kontak yang lama antara simplisia dengan pelarut, oleh sebab itu pengadukan yang sering pada proses maserasi diduga dapat menjadi penyebab banyaknya rendemen yang dihasilkan.

### 3.2 Analisis Kandungan Senyawa Skrining Fitokimia pada Ekstrak

Analisis kandungan senyawa yang digunakan pada penelitian ini adalah metode tabung. Skrining fitokimia bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman, dengan cara melihat reaksi pengujian warna menggunakan suatu pereaksi warna.

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun kacang gude

Uji Fitokimia	Pereaksi	Literatur	Hasil Uji	Kesimpulan
Alkaloid	Dragendorff	Warna merah atau jingga pada kertas saring	Larutan berwarna kuning, tanpa endapan	Negatif
	Mayer	Endapan putih	Larutan berwarna bening, tanpa endapan	Negatif
Steroid dan triterpenoid	Liebermann-Burchard	Warna hijau atau merah	Larutan berwarna hijau	Positif
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Kuning pada lapisan amil alkohol	Terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol	Positif
Saponin	Air + HCl	Busa stabil	Tidak terbentuk busa stabil	Negatif
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Hijau kehitaman atau biru tua	Larutan berwarna hijau kehitaman	Positif
Kuinon	NaOH	Warna merah	Larutan berwarna kuning	Negatif
Kumarin	Kloroform + ammonia 10%	Fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV	Tidak ada fluoresensi	Negatif

Hasil skrining fitokimia disimpulkan berdasarkan uji pereaksi warna. Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kacang gude mengandung steroid, triterpenoid, flavonoid dan tanin. Kandungan senyawa ekstrak metanol daun kacang gude memiliki perbedaan hasil dengan penelitian sebelumnya. Ashidi *et al.* (2010) menyebutkan bahwa kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak metanol daun kacang gude adalah pinostrobin JC1 (golongan senyawa flavonoid),  $\alpha$  amirin (golongan senyawa triterpenoid),  $\beta$  sitosterol (golongan senyawa steroid), asam heksadekanoat metil ester, longistilin A J3b (golongan senyawa kumarin), longistilin C JC4 (golongan senyawa kumarin). Pada penelitian ini flavonoid terdeteksi dalam ekstrak metanol daun kacang gude namun tidak dapat

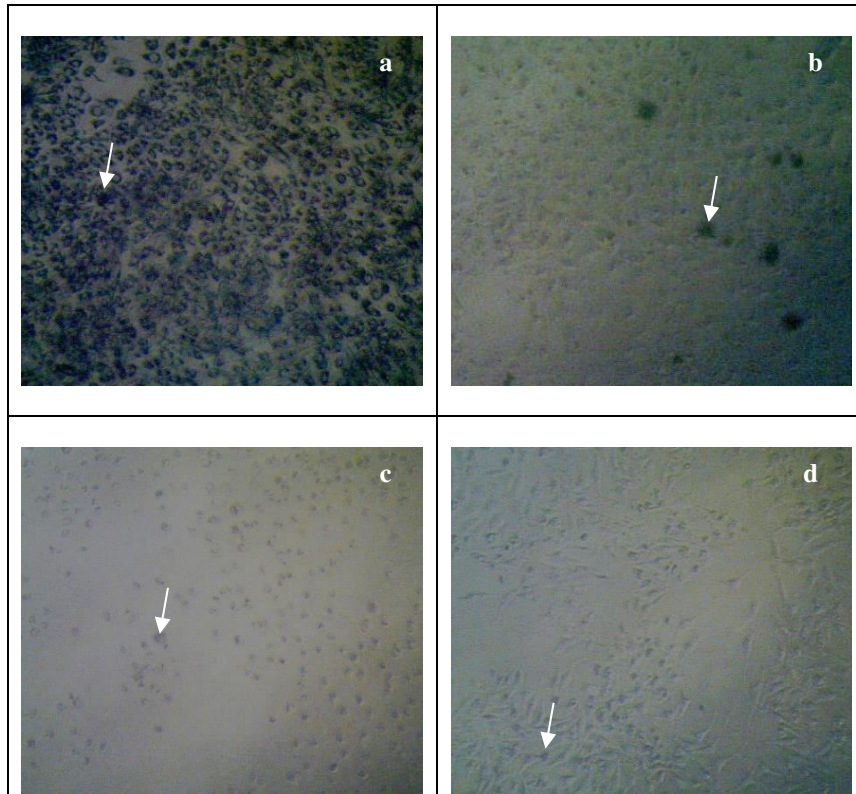
memberikan hasil senyawa yang spesifik sedangkan pada penelitian Ashidi *et al.* (2010), senyawa pinostrobin dari flavonoid dapat diidentifikasi karena senyawa dianalisis menggunakan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR). Senyawa lain yang dapat teridentifikasi pada penelitian ini antara lain steroid dan triterpenoid. Hal tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa ekstrak metanol daun kacang gude positif mengandung  $\alpha$  amirin (golongan senyawa triterpenoid) dan  $\beta$  sitosterol (golongan senyawa steroid). Golongan kumarin pada penelitian ini memberikan hasil yang negatif (Tabel 2) sedangkan pada penelitian sebelumnya ditemukan senyawa longistilin dari kumarin. Perbedaan kandungan senyawa lainnya yaitu asam heksadekanoat metil ester dari golongan asam lemak. Variasi hasil kandungan senyawa disebabkan karena pada proses ekstraksi tidak dilakukan pemanasan. Pemanasan merupakan proses fisika yang dapat mengakibatkan kerusakan klorofil (Taylor, 1984), sehingga klorofil yang ikut terekstrak diduga dapat menyebabkan hasil analisis kandungan senyawa menjadi bias.

### 3.3 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik ekstrak metanol daun kacang gude dilakukan dengan metode MTT. MTT merupakan salah satu metode umum yang dilakukan untuk menentukan jumlah sel. Berdasarkan *Cancer Chemoprevention Research Center* (2014) prinsip metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Garam kuning tetrazolium larut menjadi kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air (Siregar and Hadijono, 2000). Kristal berwarna ungu selanjutnya dilarutkan oleh reagen *stopper* yang bersifat detergenik dan diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014). Data absorbansi selanjutnya dikonversi menjadi % sel hidup untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$ .

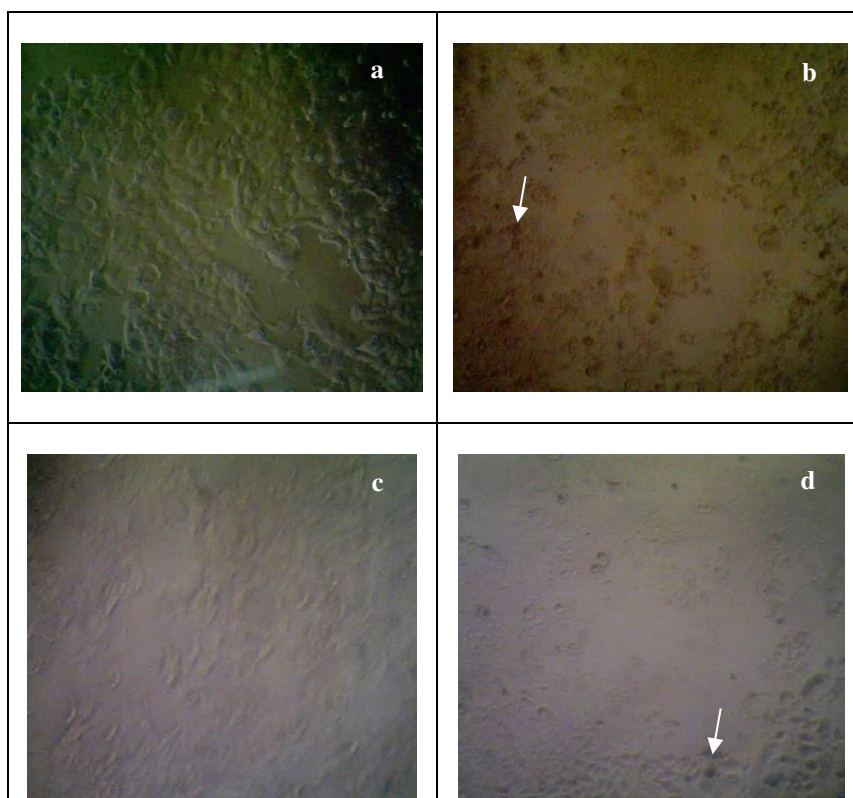
Sel T47D diberi perlakuan ekstrak metanol daun kacang gude dan kontrol positif doksorubisin kemudian dilihat perubahannya menggunakan *inverted microscope*. Gambar 1a menunjukkan terbentuknya kristal formazan pada sel T47D sebelum perlakuan ekstrak. Mekanisme pembentukan kristal formazan berhubungan dengan jumlah sel yang hidup. MTT akan pecah menjadi formazan oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang dimiliki oleh rantai pernafasan mitokondria yang hanya aktif terhadap sel hidup (Rahardhian, 2018). Sel yang mengalami kematian ditunjukkan pada Gambar 1b yaitu perlakuan oleh ekstrak dengan konsentrasi tertinggi 800  $\mu\text{g/mL}$ , kematian sel ditandai dengan warna sel yang menghitam. Sel yang mati karena perlakuan ekstrak, tidak memiliki enzim mitokondrial reduktase sehingga pada saat diberikan reagen MTT, tidak ada perubahan menjadi kristal formazan. Semakin banyak jumlah sel yang mati, maka jumlah kristal formazan yang terbentuk semakin sedikit (Nursid *et al.*, 2010). Gambar 1c merupakan perlakuan oleh ekstrak

dengan konsentrasi terendah yaitu 50  $\mu\text{g/mL}$  dan memiliki jumlah sel yang mengalami kematian lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan oleh ekstrak 800  $\mu\text{g/mL}$ . Gambar 1d merupakan morfologi sel yang mengalami kematian akibat perlakuan doksorubisin.



Gambar 1. Kristal formazan yang terbentuk pada sel T47D (a), Kematian sel akibat ekstrak pada konsentrasi 800  $\mu\text{g/mL}$  (b), Kematian sel akibat ekstrak pada konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$  (c), Morfologi sel pada perlakuan kontrol positif doksorubisin (d)

Sel MCF-7 merupakan jenis sel kanker yang banyak digunakan untuk uji secara *in vitro* karena memiliki bentuk sel yang baik (Widowati and Mudahar, 2009). Gambar 2a menunjukkan morfologi sel MCF-7 sebelum diberi perlakuan ekstrak metanol daun kacang gude berbentuk oval, sedangkan pada Gambar 2b sel berbentuk bulat dan berwarna hitam. Gambar 2b menunjukkan adanya kematian sel pada konsentrasi ekstrak tertinggi yaitu 800  $\mu\text{g/mL}$ . Apabila dibandingkan dengan Gambar 2c yaitu pada konsentrasi terendah sebesar 50  $\mu\text{g/mL}$ , jumlah sel yang berwarna hitam lebih sedikit yang menunjukkan bahwa kematian sel akibat ekstrak lebih rendah. Gambar 2d menunjukkan kematian sel ditandai dengan sel yang berwarna hitam akibat perlakuan metotreksat.



Gambar 2. Morfologi sel MCF-7 sebelum perlakuan (a), Kematian sel akibat ekstrak pada konsentrasi 800 µg/mL (b), Kematian sel akibat ekstrak pada konsentrasi 50 µg/mL (c), Morfologi sel pada perlakuan positif metotreksat (d)

Tabel 3. Hasil rata-rata % sel hidup sel MCF-7 dan T47D setelah diberi perlakuan kontrol positif metotreksat dan doksorubisin

Kontrol positif metotreksat pada sel MCF-7			Kontrol positif doksorubisin pada sel T47D		
Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata % sel hidup	SD	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata % sel hidup	SD
1,25	76,53	0,434	1,5625	6,297	1,675
2,50	78,60	0,976	3,125	4,551	0,088
5,00	81,90	2,386	6,25	2,494	0,000
10,00	79,29	0,434	12,5	2,182	0,088
20,00	83,90	0,000	25	2,182	0,265

Tabel 4. Hasil uji sitotoksik ekstrak metanol daun kacang gude terhadap sel MCF-7 dan T47D

Sel	Kadar (µg/mL)	Rata-rata % sel hidup	SD	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
MCF-7	50	117,715	1,410	566,454
	100	108,819	1,193	
	200	112,500	4,013	
	400	78,528	2,386	
	800	12,807	0,108	
T47D	50	76,561	3,498	93,353
	100	38,693	3,415	
	200	13,133	3,415	
	400	37,102	0,500	
	800	5,006	0,205	

Kontrol positif yang digunakan pada sel T47D yaitu doksorubisin sedangkan pada sel MCF-7 yaitu metotreksat. Berdasarkan penelitian Zampieri *et al.* (2002) sel-sel MCF-7 ER (Estrogen Reseptor)  $\alpha$  positif resisten terhadap sitotoksitas doksorubisin, E2 meningkatkan konsentrasi sitoplasma P-gp dalam sel MCF-7 tetapi tidak dalam sel T47D. Sel T47D mengekspresikan ER beta yang sensitif terhadap pengobatan doksorubisin (Schafer *et al.*, 2000). Doksorubisin bekerja menghambat sintesis DNA dan RNA dengan interkalasi antara pasangan basa DNA dengan penghambatan topoisomerase II sedangkan metotreksat bekerja sebagai antimetabolit folat yang menghambat sintesis DNA, berikatan dengan dihidrofolat reduktase secara ireversibel, menghasilkan penghambatan sintesis purin dan asam timidilat (*Drug Information Handbook*, 2019). Pada hasil uji sitotoksik sel T47D dan MCF-7, keduanya memiliki nilai  $IC_{50}$  pada kontrol positif doksorubisin dan metotreksat yang tidak dapat dihitung karena tidak terdapat nilai persen sel hidup yang melewati 50% (Tabel 3). Pada kontrol positif metotreksat, nilai persen sel hidup mengalami kenaikan dari konsentrasi terendah yaitu 1,25  $\mu\text{g/mL}$  ke konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$ , diduga hal tersebut dikarenakan pengaruh proses pemipetan yang dilakukan tidak dimulai dari konsentrasi terendah dan tidak dilakukan penggantian *white tip* sehingga diduga saat pemipetan terakhir yakni konsentrasi 1,25  $\mu\text{g/mL}$ , masih ada kadar metotreksat yang tertinggal. Hal tersebut berbeda dengan hasil yang seharusnya yakni semakin besar konsentrasi, penghambatan semakin besar sehingga persen sel hidup semakin kecil. Hasil kontrol positif doksorubisin pada sel T47D, persen sel hidup yang dihasilkan dari konsentrasi terendah yaitu 1,5625  $\mu\text{g/mL}$  ke konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/mL}$  mengalami penurunan nilai persen sel hidup. Konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/mL}$  dan 25  $\mu\text{g/mL}$  memiliki nilai persen sel hidup yang sama. Hal tersebut diduga karena aktivitas senyawa pada ekstrak sudah maksimal sehingga penghambatan yang terjadi pada konsentrasi 25  $\mu\text{g/mL}$  tidak mengalami kenaikan.

Pada uji sitotoksik parameter yang digunakan adalah nilai  $IC_{50}$ . Berdasarkan hasil dari uji sitotoksik pada Tabel 4, ekstrak metanol daun kacang gude memiliki nilai  $IC_{50}$  pada sel T47D sebesar 93,353  $\mu\text{g/mL}$  dan pada sel MCF-7 sebesar 566,454  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil tersebut berbeda dengan penelitian Ashidi *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa ekstrak metanol daun kacang gude memiliki efek sitotoksik terhadap tiga sel kanker, salah satunya adalah sel adenokarsinoma payudara manusia MCF-7 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 26,56  $\mu\text{g/mL}$ . Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya tempat pengambilan sampel daun kacang gude dan metode ekstraksi yang berbeda dengan penelitian sebelumnya, sehingga memiliki perbedaan pada karakteristik sampel. Pada penelitian tersebut, ekstrak metanol daun kacang gude berasal dari Nigeria sehingga terdapat beberapa perbedaan, salah satunya unsur hara tanah pada tempat tanaman tersebut tumbuh. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu perkolasi. Keuntungan ekstraksi dengan metode perkolasi yakni

proses penarikan zat yang berkhasiat pada ekstrak lebih sempurna (Pratiwi, 2010) sehingga jumlah zat aktif yang dihasilkan juga berbeda.

Menurut *United States National Cancer Institute* ekstrak tanaman dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik jika memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $\leq 20 \mu\text{g/mL}$  (Srisawat, 2013). Berdasarkan hal tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun kacang gude tidak memiliki potensi sebagai agen antikanker terhadap sel T47D karena memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $93,353 \mu\text{g/mL}$  begitupula terhadap sel MCF-7 karena memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $566,454 \mu\text{g/mL}$ .

#### 4. PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun kacang gude tidak memiliki efek sitotoksik pada sel T47D dan sel MCF-7 serta kandungan kimia pada ekstrak metanol daun kacang gude adalah steroid, triterpenoid, flavonoid, dan tanin.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ashidi J.S., P.J. Houghton P.J. Hylands and T. Efferth, 2010, Ethnobotanical Survey and Cytotoxicity Testing of Plants of South-Western Nigeria Used to Treat Cancer, with Isolation of Cytotoxic Constituents from *Cajanus cajan* Millsp. Leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 501-512.
- Astriana N.W.G., Astuti K.W., Warditiani N.K., 2013, Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.), *Jurnal Farmasi Udayana*, 2 (4), 1-4.
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2014, *Protokol Uji Sitotoksik*, Terdapat di [http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id](http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id) [Diakses pada 24 November 2018].
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Djamil R. and Anelia T., 2009, Penapisan Fitokimia, Uji BLST, dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Papilionaceae, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (2), 65-71.
- Globocan, 2012, *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*, Terdapat di [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) [Diakses pada 24 November 2018].
- Heti D., 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl.) Terhadap Sel T47D, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Kemenkes RI, 2015, *Pusat Data & Informasi Kementrian Kesehatan Indonesia: STOP KANKER*, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Koirewoa Y.A., Fatimawali and Wiyono W.I., 2012, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.), *Laporan Penelitian FMIPA UNSRAT*, 47-52.
- Maintang, Hanifa, A.P. and Agustin R., 2014, Potensi Kacang Gude Sebagai Diversifikasi Pangan, *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi*, 917-924.
- Maukar A.M., Runtuwene M.R.J. and Pontoh J., 2013, Analisis Kandungan Fitokimia dari Uji



- Toksisitas Ekstrak Metanol Daun Soyogik (*Sauraula bracteosa*) dengan Menggunakan Metode Maserasi, *Jurnal Ilmiah Sains*, 13 (2), 98-101.
- Nursid M., Pratitis A. and Chasanah E., 2010, Kultivasi Kapang MFW-01-08 yang Diisolasi dari *Ascidia Aplidium longithorax* dan Uji Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 5 (2), 103-110.
- Permawati M., 2008, Karakteristik Ekstrak Air Daun Gandarusa (*Justicia Gendarussa* Burm. F.) dan Pengaruhnya terhadap Kadar Asam Urat Plasma Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Kalium Oksanat, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Farmasi, Universitas Indonesia, Depok.
- Pratiwi E., 2010, Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif *Andrographolide* dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculate* (Burm.f.) Nees), *Skripsi*, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pujiati and Primiani C.N., 2016, Uji Antibakteri Kacang Gude (*Cajanus cajan*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Proceeding Seminar Nasional Biodiversitas VI*, 659-665.
- Pusat Data dan Informasi PERSI, 2016, *GUDE (Cajanus cajan* [Linn.] Millsp.), Terdapat di <http://www.pdpersi.co.id/persi/content/news.php?mid=5&nid=1274&catid=7> [Diakses pada 16 Januari 2019].
- Rahardhian M.R.R. and Utami D., 2018, Uji Sitotoksik dan Antiproliferasi Ekstrak Eter Daun Binahong (*Androdera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap Sel HeLa, *Media Farmasi Indonesia*, 13 (1), 1284-1292.
- Rahayu M. and Roosmarinto, 2017, Kajian Aktivitas Antikanker Ekstrak Duan Gude (*Cajanus cajan*) terhadap Sel Kanker Kolon Secara In Vitro, *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 6 (1), 1-8.
- Rasjidi I., 2007, *Kemoterapi Kanker Ginekologi dalam Praktik Sehari-hari*, Sagung Seto, Jakarta.
- Riset Kesehatan Dasar, 2013, *Cancer*, Terdapat di: [www.depkes.go.id/resource/download/general/Hasil Riskesdas 2013. pdf](http://www.depkes.go.id/resource/download/general/Hasil_Riskesdas_2013.pdf) [Diakses pada 24 November 2018].
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*, Deepublish, Yogyakarta.
- Schafer J.M., Lee E.S., O'Regan R.M., Yao K. and Jordan V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6, 4373-4380.
- Schuster R., Wolfgang H., Hannes D., Wolfram W., Helmut V., Siriporn O. and Monika M., 2016, *Cajanus cajan*- A Source of PPAR $\gamma$  Activators Leading to Anti-Inflammatory and Cytotoxic Effects, *Food & Function*, 1-9.
- Shaleh M.U., 2016, Uji Efek Antidiare Ekstrak Etanol Daun Kacang Gude (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) pada Mencit (*Mus musculus*), *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar, Makassar.
- Siregar F. and Hadijono B.S., 2000, Uji Sitotoksisitas dengan Esei MTT, *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*, 7, 28-32.
- Srisawat T., Chumkaew P., Heed-Chim W., Sukpondma Y. and Kanokwiroon K., 2013, Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of *Vatica diospyroides* Symington Type LS, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1), 71-76.

- Taylor A.J., 1984, Natural Colours in Food, *Elsevier Applied Science Pub*, London, New York cit in Oktaviani L., 1987, Perubahan-Perubahan yang Terjadi pada Ekstrak Warna Hijau Daun Suji (*Pleomele angustifolia*) Selama Penyimpanan, *Skripsi*, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Widowati L. and Mudahar H., 2009, Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Thyponium Flagelliforme* (Lood) BI) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 In Vitro, *Media Litbang Kesehatan*, 19 (1), 9-14.
- Yudissanta A. and Madu R., 2012, Analisis Pemakaian Kemoterapi pada Kasus Kanker Payudara dengan Menggunakan Metode Regresi Logistik Multinomial (Studi Kasus Pasien di Rumah Sakit “X” Surabaya), *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 1 (1), 1-6.
- Zampieri L., Bianchi P., Ruff P. and Arbuthnot P., 2002, Differential Modulation by Estradiol Of P-Glycoprotein Drug Resistance Protein Expression In Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer Cells, *Anticancer Research*, 22 (4), 2253-2259.